



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“Composición química y actividad antimicrobiana de *Hedyosmum purpurascens*  
(Chloranthaceae) de la provincia de Loja”

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTORA: Paredes Malla, María Isabel

DIRECTOR: Morocho Zaragocín, Segundo Vladimir, M.Sc.

LOJA-ECUADOR

2013

## CERTIFICACIÓN

M.Sc.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocín

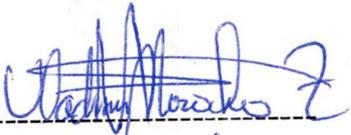
DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “**Composición química y actividad antimicrobiana de *Hedyosmum purpurascens* (Chloranthaceae) de la provincia de Loja**” realizado por la profesional en formación Paredes Malla María Isabel; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, septiembre de 2013

f)

  
CI. 1103269070

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, María Isabel Paredes Malla, declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Artículo 67 del Estatuto Orgánico de La Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”



María Isabel Paredes Malla

CI. 1105035537

## DEDICATORIA

La vida nos regala tantos momentos y con el paso del tiempo cada cosa va tomando su forma y lugar.

Dedico este trabajo principalmente a Dios quien me entregó la fe y la esperanza, dos herramientas necesarias para ir construyendo poco a poco y de menos a más los cimientos de lo que son mis sueños para plasmarlos en una realidad.

Con cariño y de forma especial dedico este trabajo a mis padres Rosa Margarita y Carlos Vicente, quienes me enseñaron de pequeña aprovechar esas oportunidades y convertirlas en grandes triunfos; su ayuda, su apoyo, su confianza, su amor me acompañaron estos años.

Se lo dedico a mis hermanos Verónica y Juan Carlos con quienes he compartido los altos y bajos del día a día, pues ellos son los responsables de levantarme en cada tropiezo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios nuestro Padre, ya que el plan que tiene para cada uno de nosotros es el mejor.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por abrirme sus puertas y acogerme en sus aulas, de las que me llevo grandes enseñanzas, recuerdos y amigos.

A M.Sc. Vladimir Morocho, mi director de tesis, quién me dio la oportunidad de realizar este trabajo y quién ha sabido guiarme con sus enseñanzas, tiempo y paciencia para alcanzar este logro. Gracias por su confianza y amistad brindadas.

A las personas que conforman el Instituto de Química Aplicada por brindarme su apoyo en todo lo que necesité.

Y finalmente agradezco a aquellas personas quienes me motivaron cada momento para conseguir este triunfo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	
1.1. Plantas medicinales.	6
1.1.1. Los metabolitos secundarios.	6
1.2. La flora Ecuatoriana.	8
1.3. La familia Chloranthaceae.	9
1.3.1. <i>Hedyosmum purpurascens</i> .	10
1.3.1.1. <i>Descripción taxonómica de Hedyosmum purpurascens</i> .	11
1.4. Métodos espectroscópicos de elucidación estructural de compuestos orgánicos.	11
1.4.1. Resonancia Magnética Nuclear RMN.	12
1.5. Enfermedades microbianas.	13
1.5.1. Bacterias.	13
1.5.1.1. <i>Bacterias Gram-Positivas</i> .	13
1.5.1.2. <i>Bacterias Gram-Negativas</i> .	13
1.5.2. Hongos.	14
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1. Recolección de material vegetal.	16
2.2. Obtención de los extractos.	17
2.3. Partición Líquido-líquido.	18
2.4. Métodos de Cromatografía.	19
2.4.1. Cromatografía de Capa Fina (CCF).	19
2.4.1.1. <i>Factor de retención (Rf)</i> .	19

2.4.2. Fraccionamiento en Cromatografía de Columna (CC).	20
2.4.2.1. <i>Punto de fusión.</i>	20
2.5. Caracterización estructural.	20
2.6. Determinación de la actividad antimicrobiana.	20
2.6.1. Microorganismos de prueba.	20
2.6.2. Preparación de los extractos.	21
2.6.3. Preparación del cultivo microbiano (Cultivo Overnight).	21
2.6.4. Preparación de la suspensión de los inóculos bacterianos.	21
2.6.5. Preparación de la suspensión de los inóculos para hongos.	22
2.6.6. Procedimiento para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.	22
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
3.1. Extractos obtenidos de la especie <i>H. purpurascens.</i>	25
3.2. Extracto de Acetato de Etilo.	25
3.3. Extracto de Metanol.	26
3.4. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>H. purpurascens.</i>	28
<b>CONCLUSIONES</b>	30
<b>RECOMENDACIONES</b>	32
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	34
<b>ANEXOS</b>	42

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Microorganismos utilizados en las pruebas y sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.
- Tabla 2.** Medio de cultivo para hongos.
- Tabla 3.** Peso de los extractos de la especie *H. purpurascens*.
- Tabla 4.** Propiedades físicas de la fracción 176.
- Tabla 5.** Comparación de datos con el espectro de  $^{13}\text{C}$  de  $\alpha$  y  $\beta$  D-glucopiranososa.
- Tabla 6.** Comparación de datos con el espectro  $^{13}\text{C}$ NMR de  $\alpha$  y  $\beta$  glucopiranososa
- Tabla 7.** Actividad antimicrobiana de los extractos totales de *H. purpurascens*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios.
- Figura 2.** Hedyosumins: sesquiterpenoides con estructura guaianica aislados de *H. orientale*.
- Figura 3.** Fotografía de *H. purpurascens* en el lugar de la recolección.
- Figura 4.** Fotografía de la muestra vegetal conservada en el Herbario UTPL.
- Figura 5.** Representación gráfica de NMR.
- Figura 6.** Esquema general del desarrollo de la investigación.
- Figura 7.** Zona de recolección de la especie *H. purpurascens*.
- Figura 8.** Diagrama de la Obtención de los extractos.
- Figura 9.** Esquema de la partición del extracto de MeOH
- Figura 10.** Representación de la Cromatografía de Capa Fina (CCF).
- Figura 11.** Medida del Factor de retención (Rf).
- Figura 12.** Cromatografía en Columna del extracto de *Hedyosmum purpurascens*.
- Figura 13.** Representación de la microplaca TC96, con 12 columnas y 8 filas (A –H).
- Figura 14.** Estructura de  $\alpha$ -D-glucopiranososa.

## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>CC</b>	Cromatografía en Columna
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b><i>Ec</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>Kp</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>n-Hex</b>	Hexano
<b>MeOH</b>	Metanol
<b><i>Pa</i></b>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<b><i>Pv</i></b>	<i>Proteus vulgaris</i>
<b>Rf</b>	Factor de retención
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b><i>St</i></b>	<i>Salmonella tiphyurium</i>
<b><i>Tm</i></b>	<i>Trichophyton mentagraophytes</i>
<b><i>Tr</i></b>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta

## Resumen

Las hojas de *Hedyosmum purpurascens* recolectadas en estado de floración, fueron sometidas a un proceso de extracción en disolventes de polaridad creciente, en Hexano, Acetato de Etilo y Metanol. A partir del extracto metanólico se pudo aislar el compuesto  $\alpha$ -D-glucopiranososa, el cual fue identificado mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . La evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica se realizó mediante el método de Microdilución en Caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), los extractos totales fueron inactivos para bacterias y hongos, pero el extracto de AcOEt presentó actividad antifúngica con un valor de CMI de 250  $\mu\text{g/mL}$  contra *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185) y *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188).

**Palabras clave:** *Hedyosmum purpurascens*,  $\alpha$ -D-glucopiranososa, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

## Abstract

The *Hedyosmum purpurascens* leaves in flowering stage were collected and subjected to extraction process with solvents of increasing polarity: n-Hexane, Ethyl Acetate and Methanol. From methanol extract was isolated  $\alpha$ -D-glucopyranose compound, which through  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR method was identified. The antibacterial and antifungal activity was measured by the microdilution broth method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The total extracts were inactive for bacteria, but the EtOAc extract showed a MIC value of 250  $\mu\text{g/mL}$  against *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC ® 28185) and *Trichophyton rubrum* (ATCC ® 28188).

**Keywords:** *Hedyosmum purpurascens*,  $\alpha$ -D-glucopyranose, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*

## INTRODUCCIÓN

La relación que ha existido desde siempre entre el hombre y los vegetales ha permitido que el ser humano se beneficie de las virtudes que éstas le brindan, ya sea como alimento o en la medicina (Rendón et al., 2001). Durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal recurso del que disponía el médico, esta situación se ha originado porque todas las culturas han empleado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Quesada, 2008).

Las plantas medicinales contribuyen al fortalecimiento de los programas de salud y también favorecen la economía de un país, esto se debe a las diferentes formas en que se aprovechan las plantas: como materia prima o como para la obtención de sustancias puras (Vega, 2011). Las plantas medicinales han sido fuente de una gran variedad de compuestos con actividad biológica, siendo utilizadas como material crudo o como compuestos puros dado que su acción terapéutica no se atribuye del todo a un compuesto aislado sino también se justifica a la demostrada por extractos o aceites esenciales (Tasleem et al., 2011). En general, los principios activos son metabolitos secundarios que no tienen un papel esencial en los fenómenos vitales de las plantas (Gómez et al., 1999).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) reconoce la importancia de las plantas medicinales en los sistemas de salud de los países y estima que hasta un 80% de la población hace uso de la medicina tradicional, considerando que estas plantas contienen sustancias que pueden ser de valor terapéutico también manifiesta que pueden mostrar un posible potencial de toxicidad cuando se utiliza de forma incorrecta.

El uso de especies medicinales y aromáticas está ampliamente difundido por todo el mundo, como es el caso de la manzanilla y el romero cultivadas en Europa y el continente americano (Moraes et al., 2006). En las ciudades ecuatorianas el uso y comercio de plantas medicinales se mantiene como una práctica activa, la información de estas ha sido difundida de diferentes maneras y el conocimiento tradicional ha evolucionado y ha sido transmitido durante generaciones en las poblaciones indígenas, mestizas y afroecuatorianas (Ríos et al., 2008; Ansaloni et al., 2010).

Los usos medicinales de las plantas reportados en Ecuador son numerosos, principalmente son utilizadas para aliviar diferentes sintomatologías como dolores de cabeza, estómago o músculos, fiebre, tos, hemorragias, además de otras afecciones como heridas, contravenenos, infecciones, entre otros (De la Torre et al., 2008).

En Ecuador se reportan 3118 especies usadas con fines medicinales, pertenecientes a 206 familias, siendo el 75 % nativas y el 5% endémicas (De la Torre et al., 2008). La familia Chloranthaceae está constituida por hierbas, arbustos o árboles aromáticos pequeños, con alrededor de 75 especies distribuidas en 4 géneros: *Chloranthus*, *Sarcandra*, *Ascarina* y *Hedyosmum* (Cao et al., 2008; Kirchner, 2010). El género *Hedyosmum* es el más abundante esta familia ya que incluyen 40 especies, 16 de estas especies se encuentran en Ecuador (Lorenzo et al., 2003; De la Torre et al., 2008).

*Hedyosmum purpurascens* es un arbusto endémico, ubicado en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe y es conocida comúnmente como toronjil (castellano). Se usa para preparar bebidas aromáticas, el tallo como combustible y para fabricar carbón (Valencia et al., 2004; De la Torre et al., 2008).

En el presente trabajo se describe el estudio fitoquímico de *H. purpurascens* y la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a cepas bacterianas y fúngicas. Hasta la fecha no se ha reportado la evaluación química y biológica de esta especie vegetal.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación: “Estudio ecológico y químico de *Hedyosmum spp.* (Chloranthaceae) en la provincia de Loja y Zamora, que se desarrolla en el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja.

# **CAPÍTULO I**

## **MARCO TEÓRICO**

## I. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Plantas medicinales.

Los recursos naturales que han sido aprovechados por distintas culturas a través de la historia son los minerales, animales y vegetales. El reino vegetal destaca porque gracias a su complejo metabolismo constituyen uno de los recursos terapéuticos más valiosos. Cada región del mundo desarrolló su forma de curar a partir de plantas medicinales, en sus prácticas utilizaban especies endémicas (Avello, 2010).

Estrella (2008) define las plantas medicinales como aquellos vegetales que elaboran sustancias que ejercen acción farmacológica, estas sustancias activas son producto del metabolismo secundario de las plantas que resultan más asimilables por el cuerpo y carecen de efectos nocivos.

#### 1.1.1. Los metabolitos secundarios.

Las plantas son fuentes de un gran número de productos metabólicos, los metabolitos primarios que desempeñan un papel esencial en el metabolismo básico de la planta son las proteínas, los ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos. Por otro lado, en la planta hay una gran cantidad de compuestos orgánicos que no están implicados directamente en el desarrollo, denominados metabolitos secundarios, su producción depende de los ciclos fundamentales de la planta; es decir, del metabolismo primario y están relacionados con sistemas defensivos o de excreción, generalmente son responsables del olor, del sabor, del color de la planta, y también de sus propiedades medicinales (Castillo y Martínez, 2007).

Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y su producción está restringida a un determinado género de plantas, a una familia o incluso pueden presentarse en una especie o en especies afines (Guarnizo et al., 2009). La formación de estos productos comienza con la fotosíntesis a partir de precursores en determinadas rutas biosintéticas, así: el ácido acético sirve de precursor de los policétidos (alifáticos y aromáticos), y de los terpenoides a través del ácido mevalónico, los compuestos aromáticos también se sintetizan a partir del ácido shikímico, los compuestos nitrogenados, en particular los alcaloides, proceden de los aminoácidos (Castillo y Martínez, 2007). En la figura 1 se observan las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios.

Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas, y cada año se describen aproximadamente 1600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los metabolitos secundarios tienen un significativo valor medicinal y económico, ejemplo de ello incluyen la nicotina, la piretrina, la rotenona que se usan como pesticidas y ciertos esteroides y alcaloides, usados como anticancerígenos como la colchicina, los derivados del *Catharanthus*, y otros alcaloides como la cocaína, tubocurarina, los de la belladona, los del opio como la codeína, morfina, papaverina. Se calcula que un 25% de medicamentos contiene un compuesto de origen natural, que se extraen de las plantas medicinales (Vega, 2001).

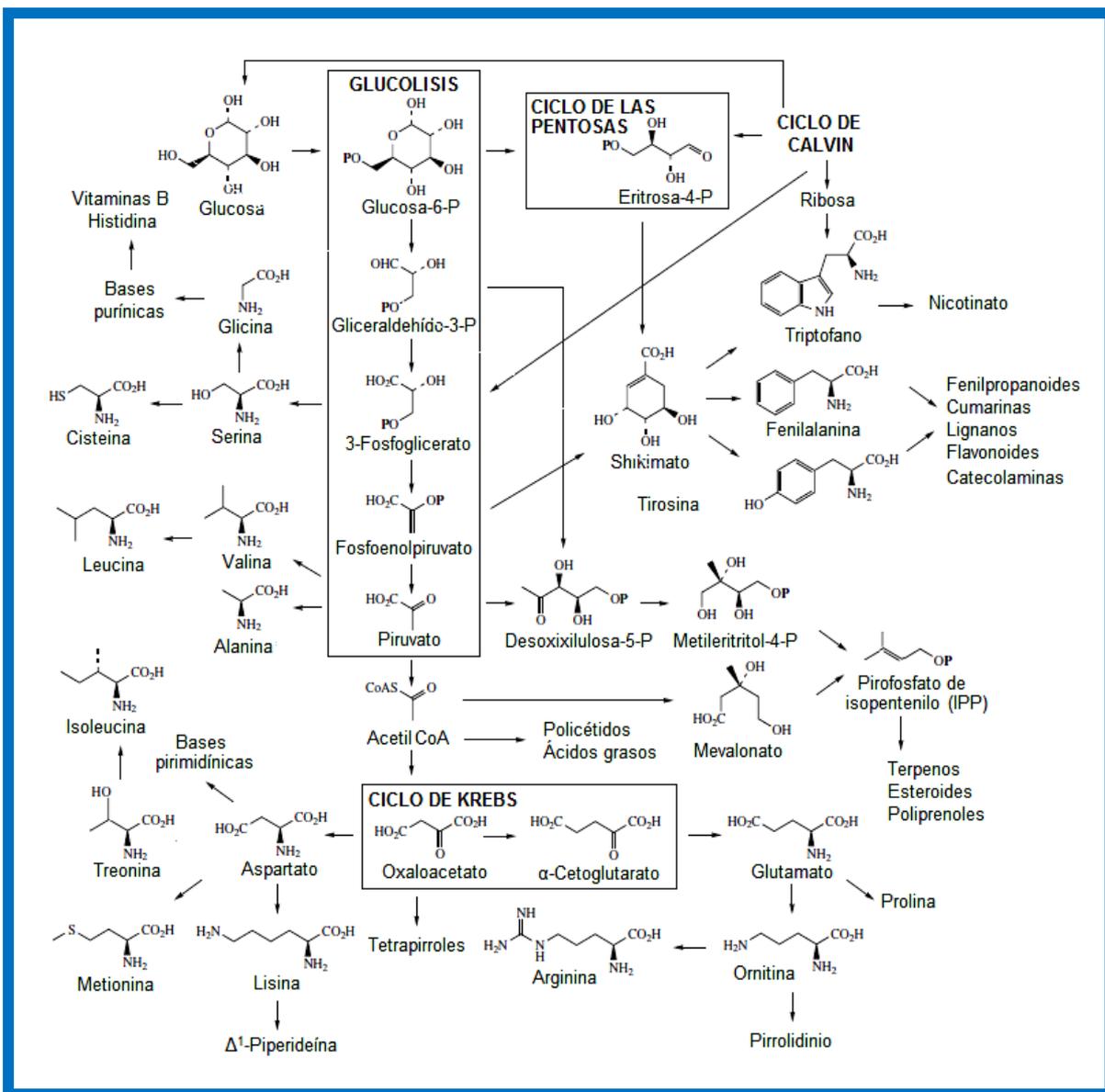


Figura 1. Rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios

Fuente: Dewick (2001)

La fitoquímica se ha dedicado al estudio de los componentes químicos de las plantas mediante la extracción de material que ha sido recolectado, secado y molido de acuerdo con procedimientos establecidos. La mayor parte de las veces, estos estudios se han hecho con

el propósito de conocer la naturaleza química de los principales componentes de las plantas, sin importar la posible aplicación de los resultados de estos estudios al enriquecimiento de los servicios de salud pública, al desarrollo socioeconómico de la sociedad y al aprovechamiento sostenible (Ocampo, 1994; Restrepo de Fraume et al., 2005).

La investigación en plantas, así como su utilización, se ha convertido en la fuente de desarrollo de los conocimientos científicos y tecnológicos, pues durante mucho tiempo fueron el principal recurso que disponía el médico; aunque el uso de plantas medicinales va en aumento, pocas han sido estudiadas, por tanto el uso popular es un indicador importante pero no es garantía de la actividad terapéutica (Quesada, 2008).

## **1.2. La flora Ecuatoriana.**

La flora neotropical es una de las más diversas en especies y endemismos, siendo la región occidental de América del Sur la que alberga la mayor parte de su riqueza (León et al., 2006).

Ecuador posee gran cantidad de especies vegetales por km<sup>2</sup>, su flora es muy rica y variada debido a la diversidad de los medios ecológicos. Se han identificado 46 ecosistemas que entre los más importantes están: los bosques occidentales, manglares, bosques andinos, la Amazonía y Galápagos; es por esto que es considerado entre los 12 países megadiversos que contienen el 70% de la biodiversidad total del planeta (Patzelt, 2002; Vásquez y Saltos, 2010).

La presencia de los Andes como factor altitudinal, ha dado al territorio ecuatoriano una fisonomía única existiendo diferentes climas y formas de vida; así como también en las profundidades de las cordilleras y que se extienden hacia el oriente y occidente existen condiciones vegetativas únicas, es por esto que el país no es completamente tropical o tórrido a pesar de estar situado en la zona ecuatorial (Patzelt, 2002).

Con el devenir del tiempo el conocimiento del uso de plantas ha evolucionado y ha sido transmitido durante generaciones en las poblaciones indígenas, mestizas y afroecuatorianas (Ríos et al., 2008). En la Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales, el 75 % de especies medicinales son plantas nativas y el 5% son endémicas. Los usos medicinales de las plantas reportados en el país son numerosos, principalmente son utilizadas para aliviar diferentes patologías como dolores de cabeza, estómago o músculos, fiebre, tos, hemorragias, además de otras afecciones como heridas, contravenenos, infecciones, entre otros (De la Torre et al., 2008).

La cantidad de especies usadas y las prácticas medicinales tradicionales podrían ser más numerosas de las que hasta ahora se han documentado y publicado; por lo tanto es fundamental continuar con estudios etnobotánicos que permitan sistematizar y difundir estos valiosos conocimientos que podrían ser de gran utilidad para toda la población ecuatoriana (Ansaloni et al., 2010).

### **1.3. La familia Chloranthaceae.**

La familia Chloranthaceae está constituida por hierbas, arbustos o árboles aromáticos pequeños y cuenta con alrededor de 75 especies comprendidas en 4 géneros: *Chloranthus*, *Sarcandra*, *Ascarina* y *Hedyosmum*, presentes en áreas tropicales y subtropicales (Cao et al., 2008; Kirchner, 2010).

El género *Hedyosmum* es el más abundante de la familia Chloranthaceae y es principalmente americano, se extiende de la parte central de México, continuando a través de Centro América hasta la parte central de Bolivia, este de Guayana y Las Antillas, y al suroeste de Asia. Su nombre "*Hedyosmum*" proviene de las palabras griegas "hedy" agradable, fragante y "osmum" olor, refiriéndose a la fragancia de las hojas comparada con la fragancia de la pimienta, el limón y el anís (Todzia, 1988; Su et al., 2008). Existen alrededor de 40 especies pertenecientes a este género, 16 de ellas están registradas en Ecuador (Jørgensen y Leon-Yanez, 1999; Kirchner, 2010).

Las especies del género *Hedyosmum* son árboles o arbustos, rara vez plantas herbáceas, fuertemente aromáticas, tienen hojas opuestas, venas pinnadas, son dentadas, pecioladas y poseen numerosos caracteres taxonómicos. Son árboles dioicos, unos árboles con flores masculinas y con flores femeninas. Los frutos son pequeños, carnosos y de color blanco al madurar. Crecen en altitudes aproximadamente de 500 hasta 2800 m s.n.m., su hábitat es en las montañas encontrándose en regiones que están bajo la influencia frecuente de las nieblas o, en zonas más secas. La infusión de las hojas de varias especies de este género se consume en forma de té, o bien, como sustituto de café. A algunas especies se les atribuyen propiedades medicinales contra variadas afecciones. (Todzia, 1988).

Estudios fitoquímicos y de actividad biológica sobre las especies de *Hedyosmum* han demostrado que poseen compuestos bioactivos, particularmente es el caso de *H. angustifolium* de donde se han obtenido algunos sesquiterpenos con actividad antileishmaniasis, además se describen estudios químicos sobre el aceite esencial (Lorenzo et al., 2003; Acebey et al., 2010). De los estudios realizados a *H. bomplandiaunum* se obtuvo un flavonoide glicosilado con actividad analgésica, este experimento fue ensayado en ratones (Cárdenas et al., 1992). Cabe mencionar que del estudio de Su et al. (2008)

sobre la especie *H. orientale* se reportan nuevos compuestos que son sesquiterpenos con estructura guaianica que se muestran en la figura 2.

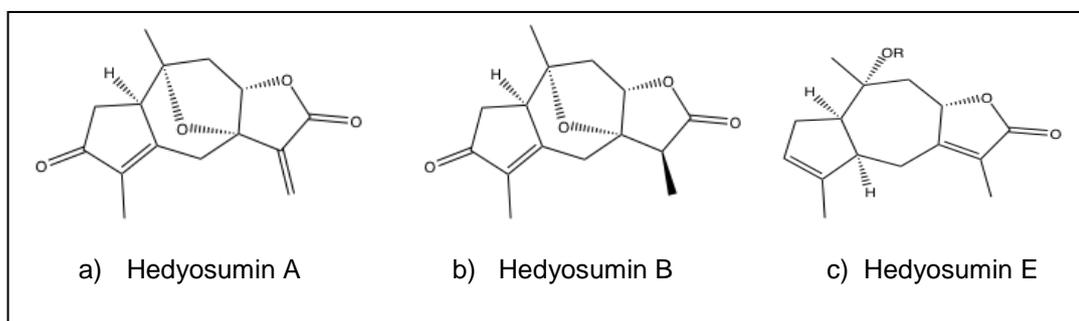


Figura 2. Hedyosumins: sesquiterpenoides con estructura guaianica aislados de *H. orientale*.

**a)** Hedyosumin A con fórmula molecular  $C_{15}H_{16}O_4$ , **b)** Hedyosumim B con fórmula molecular  $C_{15}H_{18}O_4$ , **c)** Hedyosumim E con fórmula molecular  $C_{21}H_{30}O_8$

Fuente: Su et al. (2008)

### 1.3.1. *Hedyosmum purpurascens*.

*Hedyosmum purpurascens*, arbusto endémico de Ecuador, tiene láminas foliares estrechas, brácteas florales completamente fusionadas en una matriz bráctea que encierra las flores excepto estigmas exertos. Las flores pistiladas son ligeramente trigonales que miden de 3-4 mm de largo, los estigmas son lineales y de color púrpura. La fructificación simula un tono morado a negro (Todzia, 1988).

El rango altitudinal de la especie se extiende entre 2000 y 3300 m.s.n.m. Se conoce a partir de siete poblaciones en los Andes del sur, de Loja a Zamora, Catamayo, Valladolid o Saraguro, incluyendo cuatro en el interior del Parque Nacional Podocarpus. Considerada en peligro por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), teniendo en cuenta que varios individuos se producen en el interior del Parque Nacional Podocarpus, la categoría de Vulnerable puede ser más apropiado. Algunos hábitats de la especie están siendo deforestados para producir carbón vegetal. Además de la destrucción del hábitat, no se conocen amenazas específicas (Valencia et al., 2000).

### 1.3.1.1. Descripción taxonómica de *Hedyosmum purpurascens*.

A continuación se describe la taxonomía de la especie estudiada:

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo:</b>	Tracheophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Chloranthales
<b>Familia:</b>	Chloranthaceae
<b>Género:</b>	<i>Hedyosmum</i>
<b>Especie:</b>	<i>purpurascens</i>
<b>Nombre científico:</b>	<b><i>Hedyosmum purpurascens</i> Todzia</b>

En la figura 3 y figura 4 se indica la especie vegetal: en el lugar de recolección y la muestra vegetal que se conserva en el Herbario UTPL, respectivamente.



Figura 3. Fotografía de *H. purpurascens* en el lugar de la recolección



Figura 4. Fotografía de la muestra vegetal conservada en el Herbario UTPL

### 1.4. Métodos espectroscópicos de elucidación estructural de compuestos orgánicos.

Los métodos espectroscópicos, especialmente Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarojo (IR), Ultravioleta y visible (UV/VIS) y Espectrometría de Masas (EM), son métodos físicos para la elucidación de las estructuras moleculares de los productos naturales, que permiten por comparación asignar estructuras bien sea de compuestos conocidos o nuevos, pero relacionados a otros ya identificados para deducir estructuras parciales (Marcano y Hasegawa, 2002).

### 1.4.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Este tipo de espectroscopía supone un cambio energético de los núcleos atómicos y es necesario un campo magnético para que estas variaciones de energía puedan observarse. (Durst y Gowel, 2007).

Los dos elementos más frecuentes en los compuestos orgánicos son el Carbono y el Hidrógeno, por este motivo los dos núcleos más estudiados en los experimentos son el núcleo de Hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y el isótopo del Carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (Durst y Gowel, 2007).

Todos los núcleos en las moléculas están rodeados por electrones que al aplicar un campo magnético externo, generan por sí mismos campos magnéticos que actúan en oposición al campo aplicado y debido a este efecto pueden detectarse en una molécula. Como resultado, un espectro de RMN mapea la estructura Carbono-Hidrógeno de una molécula orgánica para obtener la información estructural. Con el espectro de protones mediante la integración de las señales y el acoplamiento espín-espín se deducen el número de hidrógenos, mientras que el número de señales presentes en el espectro de carbono indica el número de carbonos presentes en la estructura (Weininger y Stermitz, 1988; Marcano y Hasegawa, 2002; McMurry, 2008).

Los espectros de RMN se representan en gráficas que muestran la fuerza del campo aplicado que aumenta de izquierda a derecha, por lo tanto, la parte izquierda de la gráfica es el lado de menor campo o campo bajo y la parte derecha es el lado de mayor campo o campo alto (McCurry, 2008).

En las gráficas de RMN se encuentra una escala llamada escala delta ( $\delta$ ), donde 1  $\delta$  es igual a 1 parte por millón (1 ppm), al utilizar este sistema de medición en el que se expresan las absorciones de RMN en términos relativos (ppm), en lugar de términos absolutos (Hz) (Ver figura 5), es posible comparar los espectros obtenidos en instrumentos diferentes (McMurry, 2008).

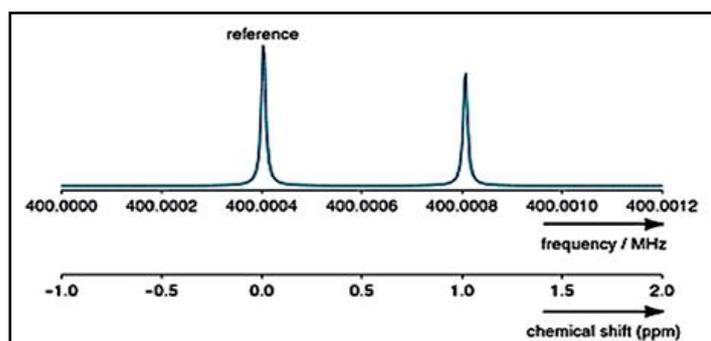


Figura 5. Representación gráfica de RMN

Fuente: Keeler(2011)

## 1.5. Enfermedades microbianas.

Es importante conocer las enfermedades que provocan los microorganismos y el modo de controlarlas. Es frecuente que un microorganismo origine la aparición de numerosas manifestaciones clínicas, o que varios microorganismos produzcan una misma enfermedad, por ejemplo: la meningitis por virus, bacterias, hongos o parásitos (Murray et al., 2009).

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción entre los microorganismos, el hospedero humano y el medio ambiente, en la actualidad el control de muchas de las enfermedades infecciosas es posible gracias al conocimiento que se tiene de los agentes causales y el mecanismo por el cual se defienden en el organismo humano (Vélez et al., 2003).

### 1.5.1. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos que poseen una amplia distribución en la naturaleza, según las características de su pared celular las bacterias pueden dividirse en dos grupos: Gram-positivas y Gram-negativas; sus diferencias estructurales tienen implicaciones importantes en la taxonomía, en la clínica y en la terapéutica (Ruiz y Moreno, 2005).

#### 1.5.1.1. Bacterias Gram-Positivas.

***Staphylococcus aureus.***- Coloniza piel, fosas nasales, puede colonizar otras áreas como el tracto gastrointestinal, alcanzar tejidos más profundos y producir infección. Aproximadamente un 20% de la población es portadora permanente de esta bacteria (Pahissa, 2009).

***Enterococcus faecalis.***- Es una enterobacteria patógena el tracto urinario, puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo, las infecciones del sistema nervioso son menos comunes (De los Ríos eds., 2005).

#### 1.5.1.2. Bacterias Gram-Negativas.

***Klebsiella pneumoniae.***- Los factores de patogenicidad son la cápsula y endotoxina, que es un factor antifagositario; puede infectar diversos tejidos, especialmente del aparato respiratorio (Romero, 2007).

***Pseudomona aeruginosa.***- Es considerablemente más resistente a los antibióticos y uno de los microorganismos responsables de bacteriemia más frecuentes, tiene una mayor mortalidad que las otras especies de *Pseudomonas* (Bodi y Garmacho, 2007).

***Proteus vulgaris.***- Su hábitat natural es el intestino del hombre analizando su patogenicidad se observa que habitualmente son poco patógenos, pero pueden originar

infecciones en diversas regiones: sistema urinario, sistema digestivo, sistema nervioso, sistema digestivo (Largo et al., 1973).

***Escherichia coli.***- Esta bacteria forma parte de la flora normal del intestino del hombre y los animales, cuando es patógena provoca un cuadro clínico con diarrea, vómitos y fiebre (Margall, 1997).

***Salmonella tiphymurium.***- Es el agente causal más frecuente de infecciones gastrointestinales que causa enfermedad diarreica bacteriana (Del Pozo et al., 2006).

### **1.5.2. Hongos.**

Los hongos son microorganismos generalmente saprofitos para el hombre; es decir, beneficiosos. En algunas ocasiones estos microorganismos se vuelven oportunistas, cuando las defensas del huésped se encuentran disminuidas, ocasionando patologías denominadas micosis (Jover y García, 2006).

Las micosis superficiales son un grupo de enfermedades localizadas en la piel y anexos, causadas por dermatofitos, levaduras y mohos diferentes a dermatofitos; por su alta frecuencia, estas micosis son un serio problema de salud pública mundial (Manzano-Gayosso, 2008).

***Trichophyton mentagrophytes.***- Produce micosis superficiales, también denominadas dermatofitosis, que afectan los tejidos de la capa cutánea, pelo y las uñas de manos y pies (Adejumo, 2009).

***Trichophyton rubrum.***-Dermatofito que produce micosis superficiales afectando tejidos ricos en queratina, tejido cutáneo inguinal, del cuerpo, pies, manos, provocando descamación, prurito, ardor, etc. (Venkatesan, 2007).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 6 se detalla la metodología utilizada:

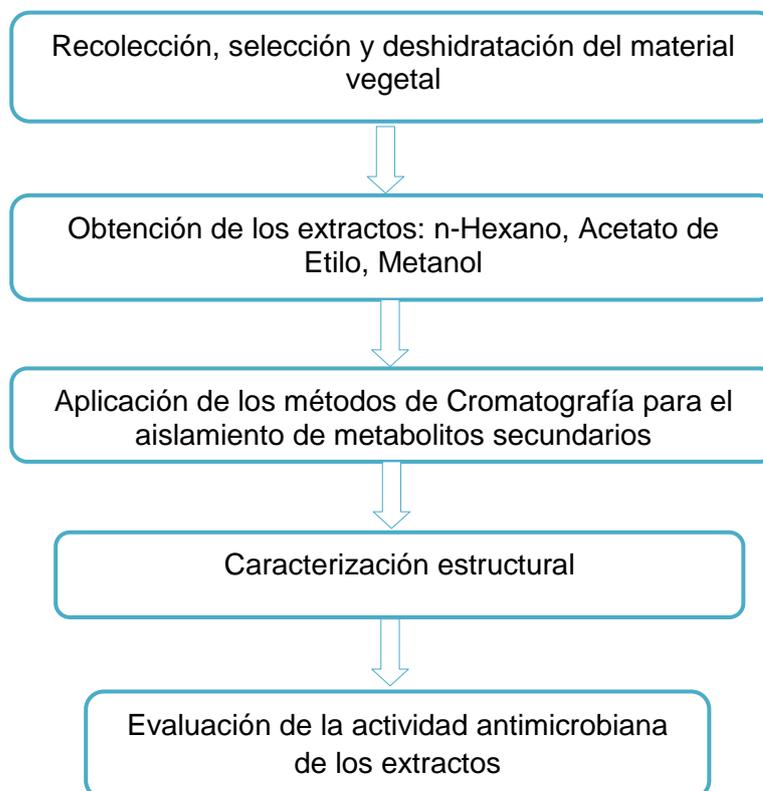


Figura 6. Esquema del desarrollo de la investigación

### 2.1. Recolección del material vegetal.

*Hedyosmum purpurascens* fue recolectada en estado de floración en Diciembre de 2011 en el sector “El Tiro”, límite entre las provincias de Loja y Zamora, a una altitud de 2795 m.s.n.m., con coordenadas: 70602E, 955887N (Ver figura 7). La caracterización botánica fue realizada por Bolívar Merino, curador del Herbario de la Universidad Nacional de Loja y Fani Tinitana, curador del HUTPL. La muestra vegetal se encuentra depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja (HUTPL) con número de voucher PPNct-005.

Durante el tratamiento post-cosecha se seleccionaron las partes aéreas, las mismas que fueron sometidas a deshidratación en la cámara de secado en la Sección de Ingeniería de Procesos; a 34 °C, durante 5 días.

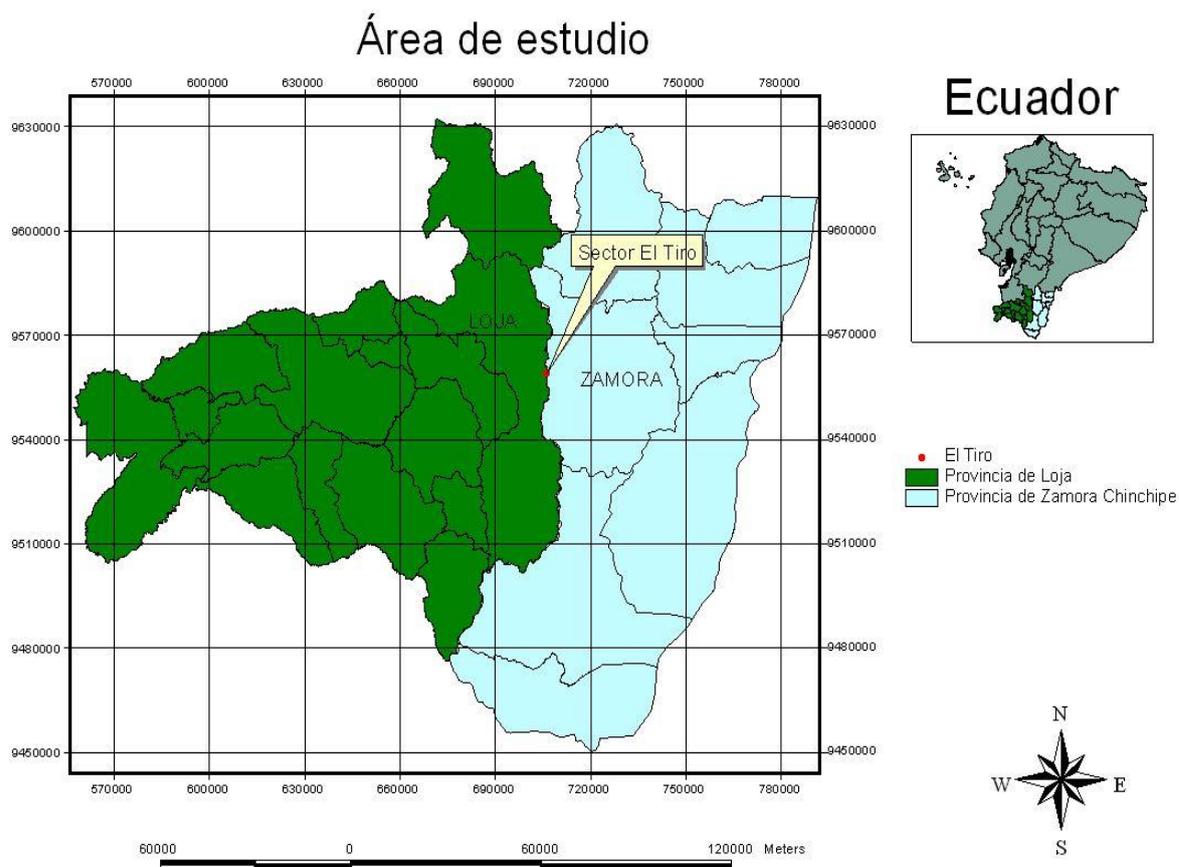


Figura 7. Zona de recolección de la especie *H. purpurascens*.

## 2.2. Obtención de los extractos.

Un aproximado de 700 g de hojas deshidratadas fueron sometidas a extracción en *n*-Hexano, Acetato de etilo y Metanol, por 24 horas, tres veces cada uno, mediante maceración estática. Posteriormente se filtró y concentró mediante rotaevaporación a temperatura ambiente obteniendo un total de tres extractos, el proceso de extracción se muestra en la figura 8.

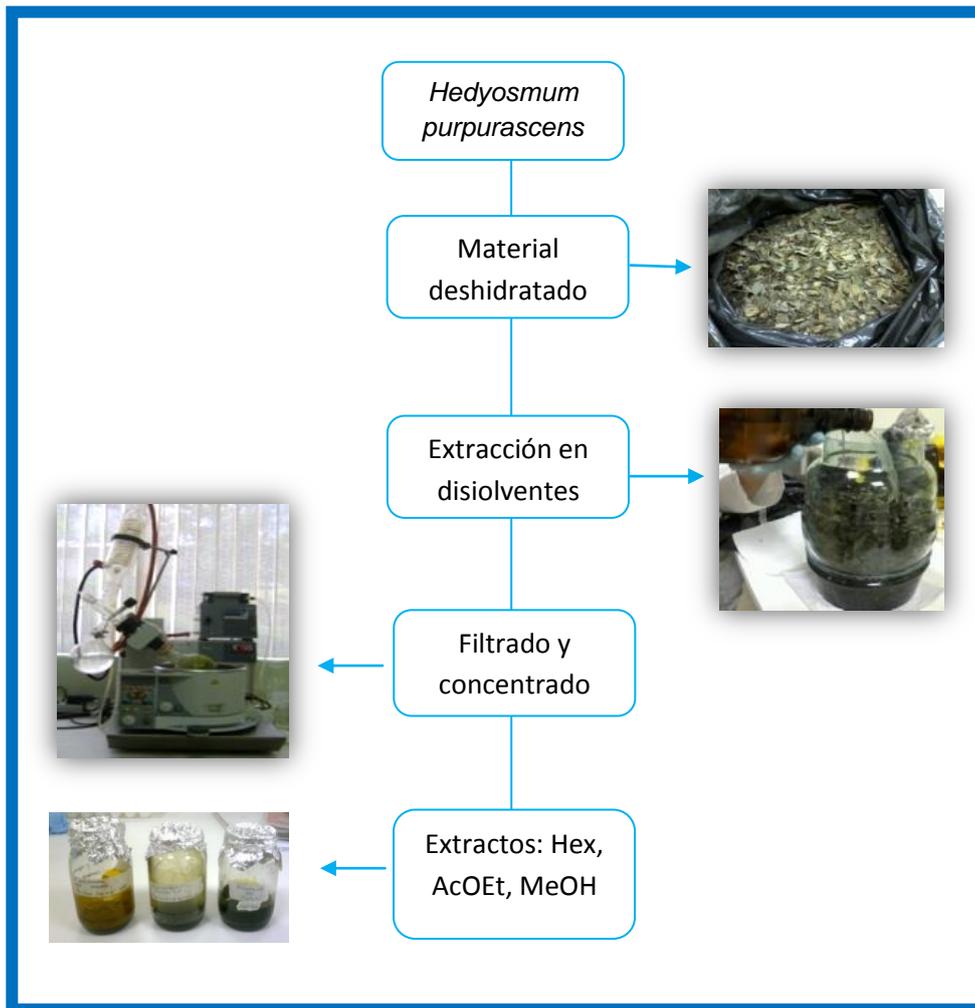


Figura 8. Diagrama de la obtención de los extractos

### 2.3. Partición líquido-líquido.

Los extractos totales fueron sometidos a partición líquido-líquido (Ver figura 9), utilizando mezcla de Hexano:(Metanol-Agua 9:1), en proporción 1-1, esto se realiza con la finalidad de eliminar grasas, aceites y clorofilas de cada extracto.



Figura 9. Esquema de la partición del extracto de MeOH

## 2.4. Métodos de cromatografía.

### 2.4.1. Cromatografía de Capa fina (CCF).

Se realizaron ensayos de cromatografía, en la que se usó una cámara de vidrio con tapa móvil, se cortaron placas de 5 cm de largo por 2 cm de ancho (Ver figura 10).

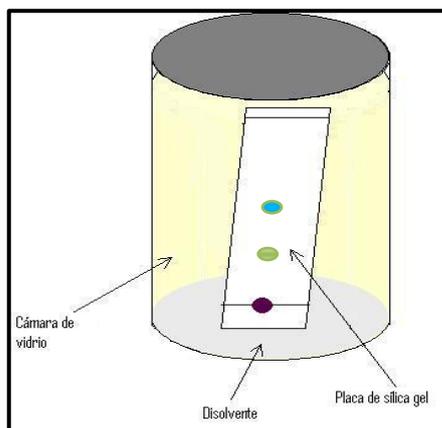


Figura 10. Representación de Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Posteriormente para observar los cromatogramas y localizar los componentes se usó luz UV en longitud de onda de 254 y 366 nm, para revelar se aplicó la técnica colorimétrica con ácido sulfúrico al 5% y vainillina.

#### 2.4.1.1. Factor de retención ( $R_f$ ).

Para determinar la migración del soluto, se determina el factor de retención o también denominado  $R_f$  que es la distancia que ha recorrido un compuesto a lo largo de la placa (Ver figura 11), se hace la relación distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por el disolvente, esto nos permite identificar un compuesto comparando con los  $R_f$  correspondientes a los patrones de los compuestos identificados.

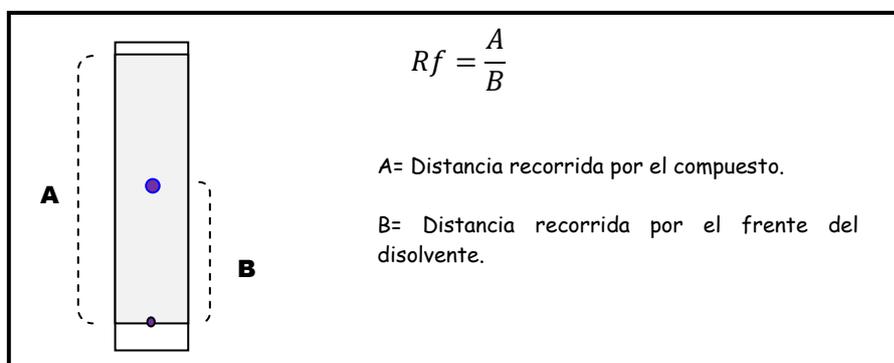


Figura 11. Medida del Factor de retención ( $R_f$ )

### 2.4.2. Fraccionamiento en Cromatografía de Columna (CC).

Se utilizó dos gramos de compuesto en Sílica Gel fase directa (Merck 0.015-0040mm) en proporción 100:1 (relación sílica: extracto) eluyendo con polaridad ascendente (*n*-Hex, AcOEt y MeOH). En la figura 12 se muestra una columna de fraccionamiento.



Figura 12. Cromatografía en Columna del extracto de *Hedyosmum purpurascens*

#### 2.4.2.1. Punto de fusión.

EL punto de fusión puede ser considerado como un criterio de pureza de un sólido, mientras tenga un rango pequeño de variación de temperatura con respecto al estándar más pura es la sustancia (Guarnizo y Martínez, 2009).

El punto de fusión se determinó en el equipo Fisher-Johns serial 40-22 de 50-60Hz.

### 2.5. Caracterización estructural.

La estructura del compuesto fue determinado usando el método espectroscópico de RMN, con el equipo Varian N° de serie 21953 operando a 400 MHz para <sup>1</sup>H y 100 MHz para <sup>13</sup>C, usando CD<sub>3</sub>OD (Ver Anexo 1 y Anexo 2).

### 2.6. Determinación de la actividad antimicrobiana.

#### 2.6.1. Microorganismos de prueba.

Los extractos fueron evaluados en contra de 9 microorganismos; 7 cepas bacterianas, 2 Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), 5 Gram-negativas: *Proteus vulgaris* (ATCC® 8427), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 9997), *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) y *Salmonella typhimurium* (LT2); y 2 cepas fúngicas *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC® 28185), *Trichophyton rubrum* (ATCC® 28188).

### 2.6.2. Preparación de los extractos.

Se preparó una disolución de 20mg/mL de extracto en 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), tanto para la actividad antibacteriana como para la actividad antifúngica.

### 2.6.3. Preparación del cultivo microbiano (Cultivo Overnight).

Para la preparación de los inóculos bacterianos y para levaduras se partió de cepas en reserva criogénica mantenidas a -80°C y luego se procedió a la siembra e incubación de las bacterias y levaduras. En la Tabla 1 se detallan las condiciones de incubación.

Tabla 1. Microorganismos utilizados en las pruebas y sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.

Microorganismos	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<b>Bacterias Gram-Negativas</b>		
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC® 27853	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 9997	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 8427	Caldo MullerHinton	37°C por 14-16 h
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h
<i>Salmonella tiphymurium</i> (LT2)	Caldo Nutritivo Oxoid	37°C por 14-16 h
<b>Bacterias Gram-Positivas</b>		
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Caldo Infusión Cerebro-Corazón	37°C por 14-16 h
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Caldo Triptisoya	37°C por 14-16 h

### 2.6.4. Preparación de la suspensión de los inóculos bacterianos.

Se preparó un cultivo overnight 24 horas antes de realizar un ensayo, del que se toman 150 a 300µL y se transfieren a un tubo con 7mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de McFarland. De esta suspensión tomamos 140µL y transferimos a 7 mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de  $2 \times 10^6$  UFC/mL; para finalizar, de esta suspensión tomamos 100 µL para completar 200µL de volumen final en la placa de cultivo, ajustando la población bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### 2.6.5. Preparación de la suspensión de los inóculos para hongos.

Se preparó la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , a una concentración definida en 7mL de Caldo Sabouraud, ver Tabla 2. De esta suspensión se usan 100  $\mu\text{L}$  para completar a 200 $\mu\text{L}$  el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a  $5 \times 10^4$  esporas/mL.

Tabla 2. Medio de cultivo para hongos.

HONGOS ESPORULADOS	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación
<i>Trichophytonmentagrophytes</i> (Tm)	Caldo Sabouraud	30°C por 96 h
<i>Trichophytonrubrum</i> (Tr)	Caldo Sabouraud	30°C por 96 h

### 2.6.6. Procedimiento para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Los valores de CMI se determinaron por el método de microdilución en caldo usando una concentración final de  $5 \times 10^5$  cfu/mL para bacterias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2) y bacterias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), y una concentración final de  $5 \times 10^4$  esporas/mL para hongos dermatofitos *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185). La CMI se define como la concentración más baja de sustancia que previene el crecimiento, la cual se determina por la presencia de turbidez después de 24 horas de incubación para bacterias o de crecimiento micelial después de 96 horas de incubación para hongos. Se preparó una disolución de extracto en DMSO a una concentración de 20 mg/mL. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Ver figura 13) y se siguió el procedimiento de dilución doble seriada para obtener concentraciones desde 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 7,81  $\mu\text{g/mL}$ . La incubación se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  para bacterias y  $30^{\circ}\text{C}$  para dermatofitos (CLSI. M7-A7; CLSI. M38-A2, 2002; CLSI. M100-S21).

Se usó gentamicina como control positivo para cinco bacterias con un valor de CMI de 0,39  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que se usó ampicilina como control positivo para *E. faecalis* and *S. typhimurium*, con un valor de CMI de 3,12  $\mu\text{g/mL}$ . Para dermatofitos se empleó Itraconazol con un valor de CMI de 0.48  $\mu\text{g/mL}$  para hongos. Como control negativo se usó DMSO.

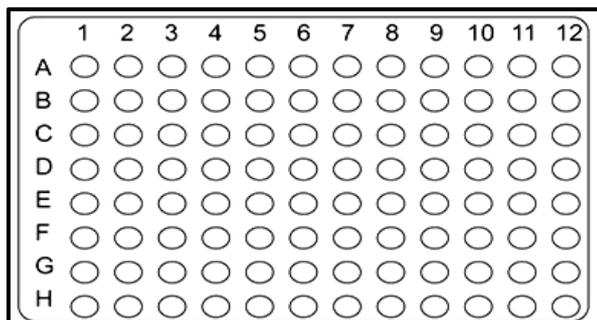


Figura 13. Representación de la microplaca TC96, con 12 columnas y 8 filas (A –H)

# **CAPÍTULO III**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Extractos obtenidos de la especie *Hedyosmum purpurascens*.

A partir de 700 g de material vegetal se obtuvieron un total de 3 extractos. Ver Tabla 3.

Tabla 3. Peso de los extractos de la especie *H. purpurascens*.

<i>Hedyosmum purpurascens</i>						
Extractos obtenidos a partir de 700 g	Extractos	Peso	%	Partición Liq.-Liq	Peso Residuo Hexánico	Peso Residuo Metanólico
	Extracto Hexano	14.54 g	2.0		7.57 g	1.68 g
	Extracto Acetato de Etilo	12.82 g	1.8		4.98 g	4.94 g
	Extracto Metanol	40.35 g	5.8		26.09 g	9.6 g

En los rendimientos de los extractos totales que se obtuvieron de la especie *H. purpurascens*, se observa que existe una variación en cuanto al rendimiento, con el extracto de AcEtO se obtuvo un valor inferior con respecto al del extracto de MeOH, esto comparando con los valores del rendimiento de los extractos de *H. angustifolium*, en donde se emplearon los mismos disolventes, la misma que no existe una diferencia significativa entre el extractos en AcEtOH con 3.8% y en MeOH con 3.9% de rendimiento (Acebey, 2007). Con estos resultados se demuestra que la obtención de extractos en especies del mismo género no es la misma dado que son diferentes, así como también se atribuye esta variación a la eliminación del solvente, ya que al eliminar los residuos del mismo en el extracto húmedo posiblemente no se realizó en la misma proporción, ya que el n-Hex y el AcEtO por sus propiedades volátiles, son más fácilmente eliminados, en cambio el metanol al ser un solvente con menor volatilidad es sometido a mayores temperaturas para alcanzar su punto de ebullición (Carrillo et al., 2011).

#### 3.2. Extracto en AcOEt.

El extracto en AcOEt sometido a fraccionamiento, se obtuvieron un total de 21 fracciones eluidas en solventes de polaridad creciente, las fracciones MP002/12, MP005/12, MP009/12-MP010/12 y MP014/12, fueron sometidas a un nuevo fraccionamiento de las que se obtuvo muy poca cantidad de las fracciones aproximadamente de 10 mg, lo que no permitió continuar con el proceso de purificación e identificación.

Por ser metabolitos secundarios, su concentración en las plantas es muy baja y muchas veces se expresan sólo en condiciones especiales, lo cual reduce su rendimiento. (Lee et al., 2010) Además, se denominan secundarios porque no todas las plantas los contienen, no

son esenciales para el funcionamiento de las plantas y en la mayoría de los casos, no se les ha encontrado una función definitiva (Vilela et al., 2011).

### 3.3. Extracto en MeOH.

Del extracto Metanólico se obtuvieron 205 fracciones y de estas, de la fracción 176, eluída en una mezcla de AcOEt:MeOH 3:7 y posteriormente purificada con acetona al 100%, se obtuvo un precipitado granuloso de color blanco, con un peso de 5 mg. Sus características físicas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades físicas de la fracción 176

Propiedades físicas	
Aspecto:	Granuloso
Color:	Blanco
Punto de fusión	147-149 °C
Soluble	Metanol

Los datos de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Espectro experimental de  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR

$^1\text{H}$ NMR (ppm)	$^{13}\text{C}$ NMR (ppm)
5.09 (d)	93.5
4.90 (s)	74.9
4.80 (s)	73.9
3.77 (dd)	73.0
3.66 (m)	71.9
3.3. (s)	62.8

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{cd}_3\text{od}$ )  $\delta$ (ppm) 93.5 ppm (C1), 73.0 ppm (C2), 73.9 ppm (C3), 74.9 ppm (C4), 71.9 ppm (C5), 62.8 ppm (C6)

Se puede diferenciar entre  $\alpha$  y  $\beta$  D-glucopiranosas por el desplazamiento químico del carbono anomérico (C1), que contiene el grupo OH en posición axial (efecto anomérico) y que en el caso de la  $\alpha$  D-glucopiranosas se encuentra a 93.6 ppm usando Metanol-d como disolvente de referencia y, para la  $\beta$  D-glucopiranosas, el carbono anomérico está a 97.4 ppm. Estos datos de desplazamiento químico se corroboran con lo descrito por Bubb, (2006), donde el carbono anomérico para la  $\alpha$  D-glucopiranosas está a 92.1 ppm, usando  $\text{D}_2\text{O}$  como disolvente de referencia y, para la  $\beta$  D-glucopiranosas, el carbono anomérico está a 96.0

ppm. Los datos comparativos de los carbonos C2, C3, C4, C5 y C6 experimentales y los descritos en literatura se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Comparación de datos con el espectro  $^{13}\text{C}$ NMR de  $\alpha$  y  $\beta$  glucopiranososa

$\delta_c$	$\alpha$ -pyranosa $\delta_c^\dagger$	$\beta$ -pyranosa $\delta_c^\dagger$	$\delta_c^{\text{Experimental}\ddagger}$
<b>C1</b>	92.1	96.0	93.5
<b>C2</b>	71.4	74.1	73.0
<b>C3</b>	71.7	74.6	73.9
<b>C4</b>	78.7	78.6	74.9
<b>C5</b>	70.4	75.1	71.9
<b>C6</b>	60.2	60.4	62.8

$\dagger$  Disolvente usado:  $\text{D}_2\text{O}$

$\ddagger$  Disolvente usado:  $\text{CD}_3\text{OD}$

Fuente: Bubb, 2006

Del análisis de datos y la comparación efectuada la estructura del compuesto aislado corresponde a la  $\alpha$ -D-glucopiranososa (figura 14), cuya fórmula molecular es  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  con un peso de 180.2 g/mol

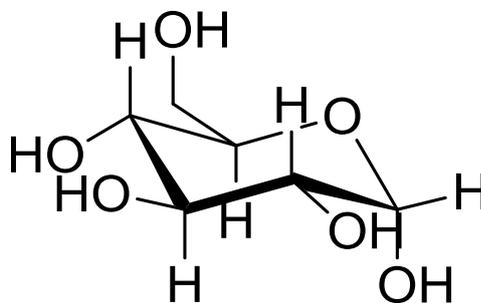


Figura 14. Estructura de  $\alpha$ -D-glucopiranososa

Fuente: ChemBioDraw Ultra v12.0

La  $\alpha$ -D-glucopiranososa se prepara por hidrólisis enzimática del almidón. (Bruneton, 2001) Es un monosacárido natural, la más importante de las aldohexosas, porque gran parte de la biomasa está formada por los polímeros de la glucosa, sobre todo en la celulosa y los almidones. (Koolman y Röhn, 2004).

En el reino vegetal se pueden encontrar una gran diversidad de monosacáridos, están dentro de los productos del metabolismo primario, son los más abundantes, aparecen en todas las plantas y desempeñan un papel esencial en el metabolismo básico de la planta e

intervienen de forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. (Castillo y Martínez, 2007).

Desde el punto de vista de la fitoterapia, dentro del grupo de los glúcidos, los compuestos más interesantes son los polisacáridos que los producen distintos organismos: hongos y bacterias, algas, plantas superiores, pues han sido utilizados en la medicina, para efectos terapéuticos asociados a antitumorales, como antitrombóticos e hipopolipidemiantes, como laxantes; en la tecnología farmacéutica, para la formulación de preparados farmacéuticos; en la cosmética, como espesantes, lubricantes; en la industria alimenticia, como fibra alimentaria ejerciendo acción en el tránsito intestinal, etc. (Castillo y Martínez, 2007).

### 3.4. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Hedyosmum purpurascens*.

Los valores de CMI que se obtuvo utilizando el Método de Microdilución en Caldo se encuentran en la Tabla 7.

Se consideró que si los extractos muestran un CMI menos de 100 µg/mL, la actividad antimicrobiana es buena; entre 100 y 500 µg/mL es moderada; de 500 a 1000 µg/mL de la es débil; más de 1000 µg/mL, el extracto se considera inactivo (Holetz et al., 2002).

Los resultados indican que los extractos de Hexano, Acetato de Etilo y Metanol son inactivos frente a las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, debido a que presentaron un CMI >1000 µg/mL.

Frente a los hongos patógenos, los extractos de Hexano y Metanol fueron inactivos; en cambio el extracto de acetato de etilo presentando un CMI de 250 µg/mL, se considera que tiene actividad moderada frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de los extractos totales de *H. purpurascens*

Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)			
Microorganismos	Hex	AcOEt	MeOH
<b>Bacterias</b>			
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC® 29212)	>1000	>1000	>1000
<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922)	>1000	>1000	>1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® 9997)	>1000	>1000	>1000
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC® 27853)	>1000	>1000	>1000
<i>Salmonella typhimurium</i> (LT2)	>1000	>1000	>1000
<i>Stafilococcus aureus</i> (ATCC® 25923)	>1000	>1000	>1000
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC® 29212)	>1000	>1000	>1000

Hongos			
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	>1000	250	>1000
<i>Trichophyton rubrum</i>	>1000	250	>1000

En la familia Chloranthaceae el género *Hedyosmum* cuenta con pocos estudios, a pesar de ser el más abundante, sin embargo de toda la familia se han obtenido alrededor de 124 compuestos, clasificados en terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos orgánicos, amidas y esteroides. Muchas plantas de esta familia han presentado actividad antibacteriana y este efecto se atribuye a la composición de los aceites esenciales, presencia de ácidos orgánicos y sesquiterpenos. (Cao et al., 2008)

En un estudio realizado por Kirchner et al., 2010 determinaron la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *H. brasilense*, frente a bacterias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, y hongos: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* a una concentración final de 2,5 a 0,078% (v / v), presentando actividad en contra de bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. saprophyticus* y *B. subtilis*) con un valor de CMI 0.312% y actividad antifúngica significativa frente a hongos dermatofitos (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*) en un rango de 0.125-0.312%.

# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- A partir del extracto de Acetato de etilo se obtuvieron fracciones con el peso muy bajo, lo cual no permitió la purificación de las mismas.
- Se identificó el compuesto  $\alpha$ -D-glucopiranososa a partir del extracto metanólico.
- Los extractos totales en Hexano y Metanol fueron inactivos frente a cepas bacterianas Gram-positiva, Gram-negativa, y a hongos dermatofitos. El extracto de Acetato de etilo presentó actividad antifúngica moderada (250  $\mu$ g//mL) frente a *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*.

# **RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *Hedyosmum purpurascens*, incrementando la cantidad de material vegetal y realizarlo por separando de acuerdo a la dioecia de la planta, pues existen evidencias de que los metabolitos secundarios se encuentran bajo una estricta regulación metabólica y su síntesis también está regulada por factores como la luz, los reguladores del crecimiento y la temperatura (Roca y Mroginski, 1993).
- Desarrollar trabajos de investigación fitoquímica en otras especies del género *Hedyosmum*, debido a que en esta familia se han demostrado la presencia de metabolitos secundarios con diversidad biogenética y estructura, tales como flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, steoids, lignina y fenoles (Trentin et al., 1999).

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Acebey, L. (2007). *Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne Hedyosmum angustifolium (Ruiz & Pavon) Solms*. Thèse Doctorat De L'Universite De Toulouse. Toulouse-Francia.
- Acebey, L., Jullian, V., Sereno, D., Chevalley, S., Estevez, Y., Moulis, C., Beck, S., Valentin, A., Gimenez, A. & Sauvain, M. (2010). Anti-leishmanial lindenane sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*. *Planta Medica*, 76(4), 365-368.
- Adejumo, T. & Bamidele, B. (2009). Control of dermatophyte-causing agents (*Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*) using six medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 906-913.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., Peñaherrera, E., Tobar, V. & De Witte, P. (2010). Estudio preliminar sobre plantas medicinales utilizadas en algunas comunidades de las provincias de Azuay, Cañar y Loja, para afecciones del aparato gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23(1), 89-97.
- Araujo, J. & Salas, R. (2009). Actividad antimicrobiana del extracto crudo de la vaina de *Caesalpinia spinosa* "tara" frente a *Staphylococcus aureus*. *Científica*, 6(2), 142-155.
- Avello, M. & Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, 138(10), 1288-1293.
- Baldry, P. (1981). *La batalla contra las bacterias*. Editorial Reverté. Barcelona.
- Ballesté, R., Mousqués, N. & Gezuele, E. (2003). Onicomycosis. Revisión del tema. *Revista Médica del Uruguay*, 19(2), 93-106.
- Bodi, M. & Garmacho, J. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. *Medicina Intensiva*, 31(2), 83-87.
- Bruneton, J. (2001). *Fitoquímica, farmacognosia*. Plantas medicinales. Tercera Edición. Editorial Acribia. Lavoisier.
- Bubb, W. (2006). NMR Spectroscopy in the study of carbohydrates characterizing the structural complexity. *Wiley Periodicals, Inc*, 19(1), 1-19.
- Cao, C.M., Peng, Y., Shi, Q.W. & Xiao, P.G. (2008). Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry & biodiversity*, 5(2), 219-238.

- CLSI, C.a.L.S.I. (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, in Approved Standard-Second Edition Method M38-A2, Wayne Ed. p. 1-27.
- CLSI, C.a.L.S.I. (2006) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically, in Approved Standard-Seventh Edition, Wayne Ed. p. 1-4.
- CLSI, C.a.L.S.I. (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing], in Twenty first Informational supplement, Wayne Ed. p. 1-165
- Campbell, N. & Reece, J. (2007). *Biología*. Séptima Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Cardenas, L., Rodríguez, J., Villaverde, M., Riguera, R., Cadena, R. & Otero, J. (1992). The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Médica*, 59(1), 26-27.
- Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., Ibáñez, L., Fujita, R. & Barnett, E. (2008). Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglicemiante. *Revista Horizonte Médico*, 8(1), 6-34.
- Castillo, E. & Martínez, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. Editorial Elsevier Masson. Barcelona.
- Cerón, C. & Montalvo, C. (1998). *Etnobotánica de los huaorani de quehueiri-ono, Napo-Ecuador*. Editorial Abya Yala. Quito.
- Dewick, P. (2001). *Medicinal Natural Products*. Second Edition. Editorial John Wiley and Sons. England.
- Durst, H. & Gowel, G. (2007). *Química orgánica experimental*. Editorial Reverté. Barcelona.
- De la Torre, L., Navarrete H., Muriel M. P., Macía, M. & Balsel, H. (Eds.). (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J. & Ribadeneira, M. (2005). *Biodiversidad y Recursos Genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador*. Ediciones Abya Yala, Quito.

- De los Ríos, J. y De los Ríos, S. (Eds.). (2005). Cirugía Urología. Editorial Universidad de Antioquía. Medellín.
- De Feo, V. y Urrunaga, R. Composition of essential oil of *Hedyosmum scabrum*. *Jeobp*, 10(1), 41-45.
- Del Pozo, L.; Silva, N.; Valencia, A.; Soto, J; Riveros, J.; Sacsquispe, R.; Calderón, R. & Suarez, V. (2006). Estudio de un brote intrahospitalario por *Salmonella typhimurium* productora de beta-lactamasa de espectro extendido SHV-5. *Anales de la Facultad de Medicina*, 67(4), 318-326.
- Gómez, G., Villamarino, T. & Rofríguez, J. (1999). *Las plantas de extractos, bases para un plan de desarrollo del sector*. Editorial Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid.
- Guarnizo, A. & Martínez, P. (2009). *Experimentos de Química Orgánica, con enfoque en ciencias de la vida*. Editorial Elizcom. Quindío, Colombia.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–31.
- Jørgensen, M & León-Yáñez, S. 1999. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri.
- Jover, A. & García, M. (2006). *Generalidades sobre los grupos terapéuticos para los auxiliares de farmacia*. Editorial MAD, S. L. Sevilla.
- Keeler, J. (2011). *Understanding NMR Spectroscopy*. Second Edition. Editorial John Wiley & Sons. Singapore.
- Kirchner, K., Wisniewski Jr. A., Cruz, A., Biavatti, M. & Netz, D. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(5), 692-699.
- Koolman, J. y Röhm, KH. (2004). *Bioquímica: textos y atlas*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Largo, R.; Dosnos, J. & Pruyas, M. (1973). Neuropatía a proteus. *Revista Chilena de Pediatría*, 44(4), 354-358.
- Lee, E., Jin, Y., Park, J., Yoo, Y., Hong, S., Amir, R., Yan, Z., Kwon, E., Elfick, A., Tomlinson, S., Halbritter, F., Waibel, T., Yun, B., & Loake, G.(2010). Cultured cambial

- meristematic cells as a source of plant natural products. *Nature Biotechnology*, 28(11), 1213-1217.
- Lorenzo, D., Loayza, I. & Dellacassa, E. (2003). Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(1), 32–35.
- Macas, D. y Paccha, M. (2012). *Aislamiento de metabolitos bioactivos de procesos fermentativos de actinobacterias recolectadas en ecosistemas marinos*. (Trabajo de fin de carrera previa a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico). Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.
- Manzano-Gayosso, P. (2008). Las micosis superficiales: su relevancia médica y socioeconómica. *Gaceta Médica de México*, 144(2), 123-124.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (Eds.). (2002). *Fitoquímica orgánica*. Editorial Torino. Venezuela.
- Margall, N.; Domínguez, A.; Prats, G. & Salleras, L. (1997). *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 71(5), 437-443.
- McMurry, J. (2008). (Ed.). *Química Orgánica*. 7ma Edición. Editorial Cengage Learning™. México.
- Moraes, M., Ollgaard, B., Kvist, L.P., Borchsenius, F. y Balsev, H. (Eds.). (2006). *Botánica económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia. [Versión de BEISA] Recuperado de: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Beisa%20book.html>
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. Sexta Edición. Editorial Elsevier. España.
- OMS. (2008). Organización Mundial de la Salud. Avanza la lucha contra las enfermedades infecciosas desatendidas en las Américas y en el mundo. Recuperado de: [http://www.paho.org/par/index.php?option=com\\_content&task=view&id=884&itemid=99999999](http://www.paho.org/par/index.php?option=com_content&task=view&id=884&itemid=99999999)
- Pahissa, A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Editorial Marge Medica Books. Barcelona.

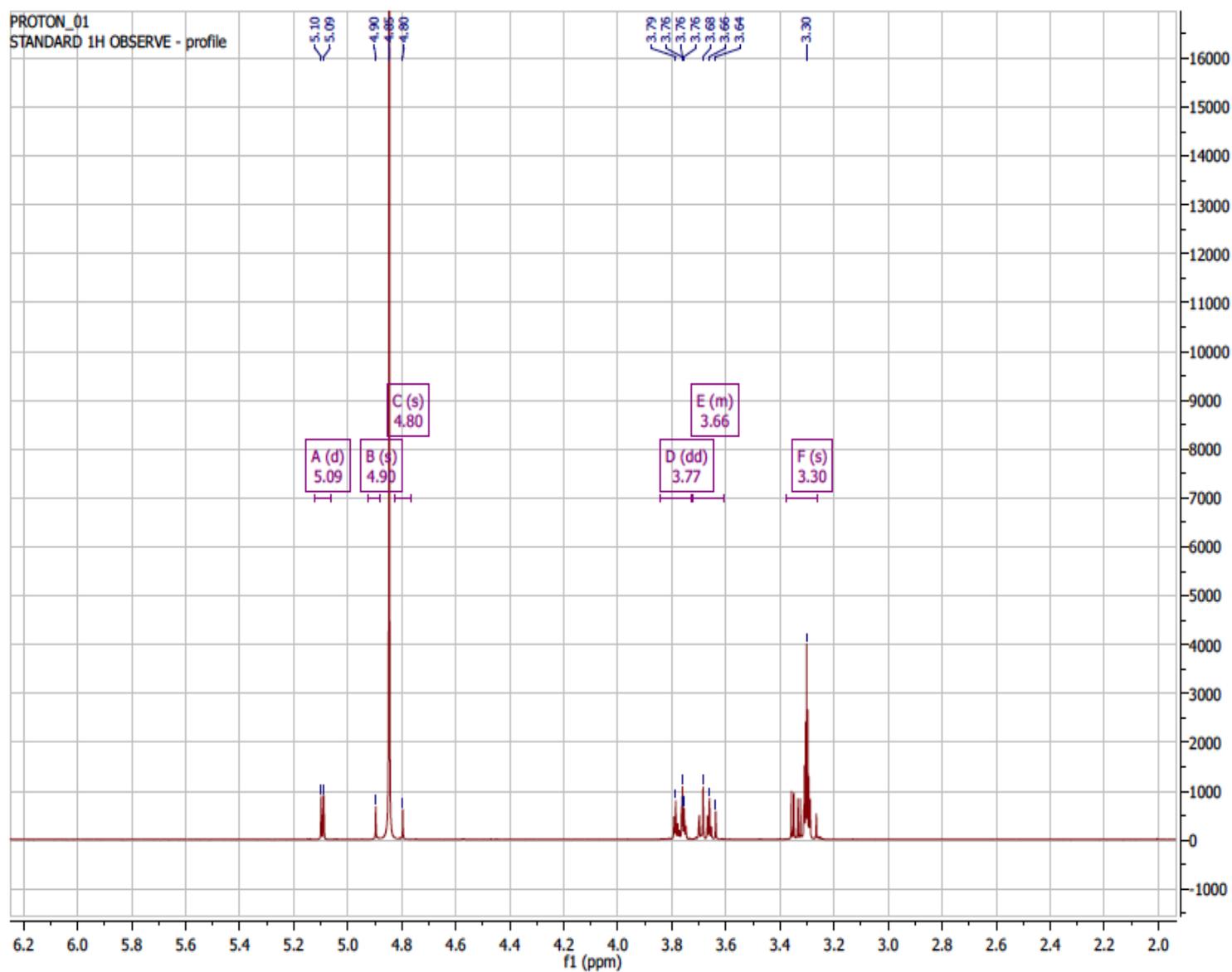
- Patzelt, E. (2002). *Flora del Ecuador*. Editorial Cámara Ecuatoriana del Libro - Núcleo de Pichincha. Quito.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 11(4), 195 – 211.
- Prats, G. (2008). *Microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Quesada, A. (2008). Las plantas medicinales. *Revista Biocenosis*, 21(1), 20-23.
- Ramírez, R. (2012). *Alimentación Del Venado Cola Blanca: Biología y Ecología Nutricional*. Editorial Palibrio. EE.UU.
- Raven, P., Evert, R. & Eichhorn, S. (Ed.). (1992). *Biología de las plantas*. Editorial Reverté S.A. Barcelona.
- Rendón, B., Domínguez, S., Nieto, Javier & Martínez, M. (2001). *Plantas, cultura y sociedad: Estudio sobre la relación entre humanos y plantas en los albores del siglo XXI*. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI). México.
- Restrepo de Fraume, M., Quintero, P. & Fraume, N. (2005). *El milagro de las Plantas. Aplicaciones medicinales y orofaríngeas*. Fundación Hogares Juveniles Campesinos. Editorial San Pablo. Bogotá, Colombia.
- Ríos, J. & Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 80-84.
- Ríos, M., De la Cruz, R. & Mora, A. (2008). *Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador: Saberes y Prácticas*. IEPI. Ediciones Abya Yala, Quito.
- Roca, W. & Mroginski, L. (Eds.). (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali.
- Valencia, R., Pitman, N. León-Yáñez, S. & Jørgensen, P. (Eds.). (2004). Libro Rojo de las plantas Endémicas 2000. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. México.

- Ruiz, V. & Moreno, S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Su, ZS., Yin, S., Zhou, ZW., Wu Y., Ding J., Yue JM. (2008). Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1410-1413.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Publicaciones de la Universidad Jaume. Castellón de la Plana.
- Tasleem, A., Mandal, T. & Dabur, R. (2011). Natural products: Anti-fungal agents derived from plants. *Research Signpost*, 37/661 (2), 283-311.
- Todzia, C. A. (1988). Chloranthaceae: *Hedyosmum*. Flora Neotropica Monograph 48. Publicado por: New York Botanical Garden Press. [Versión de JSTOR]. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/i400199>
- Trentin, A., Santos, A., Guedes, A., Pizzolatti, M., Yunes, R. & Calixto, J. (1999). Antinociception caused by the extract of *Hedyosmum brasilense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hidroxy-8,9-dehidroshizukanolide. *Planta Médica*, 65(6), 517-521.
- Ulloa Ulloa, C. & Jørgensen Moller, P. (Eds.). (1995). *Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador*. [Versión Efloras.org] Recuperado de: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=201&taxon\\_id=114826](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=114826)
- Ulloa, C. y Neil, D. (2005). Adiciones a la Flora del Ecuador, 1999-2004. Missouri Botanical Garden, P.O Box 299, St. Louis, MO. 63166-0299, EUA. Herbario Nacional del Ecuador, Casilla 12-21-1787. Quito, Ecuador.
- Valgas, C., De Souza, S., Smania, E. & Smania Jr., A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Vásquez, L. & Saltos, N. (2010). *Ecuador su realidad*. Décima Octava Edición. Editorial Fundación José Peralta. Quito.
- Vega, M. (2001). *Etnobotánica de la Amazonía peruana*. Ediciones Abya-Yala. Quito.
- Vélez, H., Rojas, E., Borrero, J. & Restrepo, J. (2003). *Enfermedades infecciosas*. Sexta Edición. Editorial CIB. Bogotá.

- Venkatesan, G.; Ranjit, A.; Murugesan, A.; Janaki, C. & Gokul, S. (2007). *Trichophyton rubrum*– the predominant etiological agent in human dermatophytoses in Chennai, India. *African Journal of Microbiology Research*, 009-012.
- Vilela, A., González-Paleo, L. & Ravetta, D. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral* 21, 317-327.
- Weininger, S & Stermitz, F. (Eds.). (1988). *Química orgánica*. Editorial Reverté. España.

# **ANEXOS**

ANEXO 1  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz)



ANEXO 2  
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz)

